

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-344464

(43)公開日 平成4年(1992)12月1日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>  
G 0 1 N 33/533  
C 1 2 Q 1/68

識別記号  
G 0 1 N 33/533  
A 8114-4B

府内整理番号

8310-2J

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 9 (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平3-117167

(22)出願日 平成3年(1991)5月22日

(71)出願人 000004455

日立化成工業株式会社

東京都新宿区西新宿2丁目1番1号

(72)発明者 田井 賢司

茨城県日立市東町4丁目13番1号 日立化成工業株式会社茨城研究所内

(72)発明者 片寄 光雄

茨城県日立市東町4丁目13番1号 日立化成工業株式会社茨城研究所内

(72)発明者 渡辺 博夫

茨城県日立市東町4丁目13番1号 日立化成工業株式会社茨城研究所内

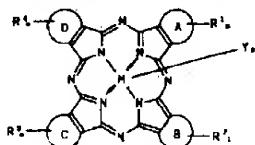
(74)代理人 弁理士 若林 邦彦

(54)【発明の名称】 蛍光標識用色素、蛍光標識用色素で標識された生物由来物質、及びそれらを含有する試薬

(57)【要約】

【目的】 660 nm以下に発振波長をもつ小型で安価な半導体レーザを用いて測定するための、種々の抗原・薬物の分析、あるいはDNAの塩基配列の分析等に有用な試薬又は臨床検査試薬を提供する。

【構成】 式(1)で表される蛍光標識用色素、その蛍光標識用色素で標識された抗原、抗体、もしくはエクレオチド等の生物由来物質、又はこれらを含有する試薬。これらは、血液中の種々の抗原・薬物の分析やDNAの塩基配列の分析等に利用される。



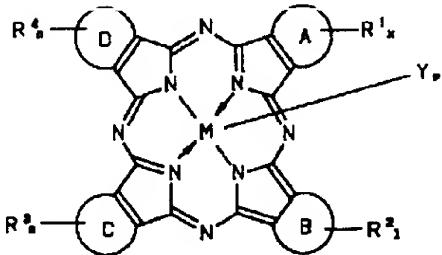
(Mは、H<sub>2</sub>、A I等。A、B、C、及びDで示される芳香環は、チオフェン環、フラン環等。R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>は、-X-Q-W、-Q-W、-W又は水素原子を示し、Xは、酸素原子、窒素原子等、Qは、XとWの結合基、Wは-OH、-O-等。k、l、m及びnは、0

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 化1

【化1】



10

【化1中、Mは、H<sub>2</sub>、Al、Si、P、Ga、Ge、Cd、Sc、Mg、Sn又はZnを示し、A、B、C、及びDで示される芳香環は、それぞれ独立にチオフェン環、フラン環、ピロール環、イミダゾール環、チアゾール環、オキサゾール環、イソチアゾール環又はピラゾール環を示し、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>は、それぞれ独立に、-XQW、-QW、-W又は水素原子を示し、Xは、酸素原子、窒素原子、イオウ原子、リン原子、ケイ素原子、セレン原子、CR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>（ただし、R<sup>5</sup>及びR<sup>6</sup>は、それぞれ独立に、水素原子、アルキル基、アリール基又はアラルキル基であり、R<sup>5</sup>R<sup>6</sup>としてカルボニル酸素でもよい。）、又はフェニレン基を示し、Qは、XとWの結合基（リンカー）を示し、Wは-OH、-O-、-SH、-S-、-CO<sub>2</sub>H、-CO<sub>2</sub>-、-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>CO<sub>2</sub>H、-OCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-、-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>、-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>、-SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>、-SO<sub>2</sub><sup>2-</sup>、-SO<sub>2</sub>Cl、-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、-NH<sub>2</sub>、-NHR<sup>7</sup>、-NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>又は-N(+R<sup>10</sup>R<sup>11</sup>R<sup>12</sup>）（ただし、R<sup>7</sup>～R<sup>12</sup>は、それぞれ独立にC<sub>1</sub>～C<sub>10</sub>のアルキル基、C<sub>6</sub>～C<sub>12</sub>のアリール基又はC<sub>6</sub>～C<sub>12</sub>のアラルキル基である。）であり、k、l、m及びnは、それぞれ独立に0～4の整数を示し、Yは、ハロゲン原子、-OR<sup>13</sup>又は-NR<sup>14</sup>（ただし、R<sup>13</sup>及びR<sup>14</sup>は、それぞれ独立に、水素原子、親水性置換基を有するものであってもよいアルキル基、親水性置換基を有するものであってもよいアシル基、親水性置換基を有するものであってもよいシリル基又は親水性置換基を有するものであってもよいリン原子含有基である。）を示し、pは、YのMへの結合数を表す0～2の整数を示す。】で表される蛍光標識用色素。

【請求項2】 請求項1記載の蛍光標識用色素を含有する試薬。

【請求項3】 請求項1記載の蛍光標識用色素で標識された生物由来物質。

【請求項4】 請求項3記載の標識された生物由来物質を含有する試薬。

【請求項5】 生物由来物質が抗原、抗体又はヌクレオチドである請求項3又は請求項4記載の試薬。

【請求項6】 抗原が薬物である請求項5記載の試薬。

2

【請求項7】 抗体がモノクローナル抗体である請求項5記載の試薬。

【請求項8】 ヌクレオチドがオリゴヌクレオチド又はオリメクレオチドである請求項5記載の試薬。

【請求項9】 ヌクレオチドがATP、CTP、GTP、TTP、UTP、dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP、ddATP、ddCTP、ddGTP、ddTTP、ddUTP又はこれらの誘導体である請求項5記載の試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、蛍光標識用色素、蛍光標識用色素で標識された生物由来物質、及びそれらを含有する試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】 フタロシアニン系顔料は、環状共役鎖を構成する4つの窒素原子によって結合された4個のイソイントール部分を有する有機顔料である。これらの顔料に用いられている化合物としては、フタロシアニン（青緑）、銅フタロシアニン（青）、塩素置換銅フタロシアニン（緑）、スルホン化銅フタロシアニン（緑）等がある。フタロシアニン系顔料は、一般に、エナメル、プラスチック、リノリウム、インク、壁紙、織物、紙、ゴム製品などに使用されている。いっぽう、フリーベースフタロシアニン、アルミニウム、カドミウム、マグネシウム、シリコン、すず及び亜鉛フタロシアニンが螢光を示すことが報告された（The Phthalocyanines 1:127, 1983）。

【0003】 また、フタロシアニン類は種々の免疫分析に使用できることが種々報告されている（US特許第4,160,645号公報、US特許第4,193,983号公報、US特許第4,220,450号公報、US特許第4,233,402号公報、US特許第4,235,869号公報、US特許第4,256,834号公報、US特許第4,277,437号公報、US特許第4,318,707号公報、US特許第4,483,929号公報、US特許第4,540,660号公報、US特許第4,540,670号公報、US特許第4,560,534号公報、US特許第4,650,770号公報、US特許第4,656,129号公報、US特許第4,659,676号公報）。

【0004】 更に、フタロシアニン類は、化学発光免疫分析系で触媒として使用されている（Bull. Chem. Soc. Jpn. 第56巻、2965-2968頁（1983）、同第56巻、2267-2271頁（1983）、同第57巻、587-588頁（1984）、同第57巻、3009-3010頁（1984）、同第58巻、1299-1303頁（1985））。原らは、ルミノールと過酸化水素とのあいだの化学発光反応の触媒として鉄フタロシアニンを用いて、

化学発光のシグナル量から、テストサンプル中の分析対象を定量している。彼らは鉄及びコバルトのフタロシアニン並びに鉄、パラジウム、白金、マンガン及びスズのポルフィリン錯体について検討し、鉄フタロシアニンが最も優れた触媒作用を示し、かつ高感度であることを報告した。

【0005】免疫分析で着色物質のほかに螢光物質が広く利用されているが、さらに、酵素免疫分析においても、螢光物質は感度を上げることができるので着色物質よりも好んで使用されるようになってきている。よく知られた螢光物質-酵素対はアルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase) と4-メチルウムベリフェリホスフェート (4-methylumbelliferyl phosphate)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -galactosidase) と4-メチルウムベリフェリ-D-ガラクトビラノシド (4-methylumbelliferyl-D-galactopyranoside)、西洋ワサビのパーオキシダーゼ (horse radish peroxidase) とp-ヒドロキシフェニル酢酸 (p-hydroxyphenyl acetic acid) 等があり、これらの系の検出感度は  $10^{-15}$  M である。しかし検出感度をさらに上げようとしても生成する螢光体の分析特性には限界がある。

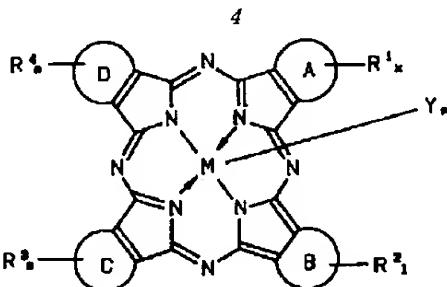
【0006】最近、螢光量子収率が高く、水に対して高い溶解性を示すフタロシアニン類を用いた試薬が提案された (WO特許第88/04777号公報、WO特許第90/02747号公報、特開平1-233222号公報)。

【0007】しかし、フタロシアニンは吸光係数の特に大きなQ (0, 0) 吸収帯が 665 ~ 680 nm の領域にあって、660 nm 以下の波長域では吸収は比較的に小さいので、660 nm 以下に発振波長をもつ安価で小型の半導体レーザーを用いた測定装置を使用した場合には、検出薬としての優れた役目を期待できない。

【0008】本発明は、660 nm 以下の発振波長をもつ小型で安価な半導体レーザーを用いて測定するための、種々の抗原、薬物の分析やあるいはDNAの塩基配列の分析等に有用な試薬又は臨床検査試薬を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は下記 (1) ~ (9) に関するものである。すなわち、(1) 化2



【化2】中、Mは、H<sub>2</sub>、Al、Si、P、Ga、Ge、Cd、Sc、Mg、Sn又はZnを示し、A、B、C、及びDで示される芳香環は、それぞれ独立にチオフェン環、フラン環、ピロール環、イミダゾール環、チアゾール環、オキサゾール環、イソチアゾール環又はピラゾール環を示し、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>は、それぞれ独立に、-XQW、-QW、-W又は水素原子を示し、Xは、酸素原子、窒素原子、イオウ原子、リン原子、ケイ素原子、セレン原子、CR<sup>5</sup>R<sup>6</sup> (ただし、R<sup>5</sup>及びR<sup>6</sup>は、それぞれ独立に、水素原子、アルキル基、アリール基又はアラルキル基であり、R<sup>5</sup>R<sup>6</sup>としてカルボニル酸素でもよい。)、又はフェニレン基を示し、Qは、XとWの結合基 (リンカー) を示し、Wは-OH、-O<sup>-</sup>、-SH、-S<sup>-</sup>、-CO<sub>2</sub>H、-CO<sub>2</sub><sup>-</sup>、-OC<sub>2</sub>H、CO<sub>2</sub>H、-OCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>、-PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>、-SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>、-SO<sub>2</sub><sup>-</sup>、-SO<sub>2</sub>Cl、-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、-NH<sub>2</sub>、-NHR<sup>7</sup>、-NR<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>又は-<sup>14</sup>N (+) R<sup>10</sup>R<sup>11</sup>R<sup>12</sup> (ただし、R<sup>7</sup> ~ R<sup>12</sup>は、それぞれ独立にC<sub>1</sub> ~ C<sub>10</sub>のアルキル基、C<sub>6</sub> ~ C<sub>12</sub>のアリール基又はC<sub>6</sub> ~ C<sub>12</sub>のアラルキル基である。)であり、k、l、m及びnは、それぞれ独立に0 ~ 4の整数を示し、Yは、ハロゲン原子、-OR<sup>13</sup>又は-NR<sup>14</sup> (ただし、R<sup>13</sup>及びR<sup>14</sup>は、それぞれ独立に、水素原子、親水性置換基を有するものであってもよいアルキル基、親水性置換基を有するものであってもよいアシリル基、親水性置換基を有するものであってもよいシリル基又は親水性置換基を有するものであってもよいリン原子含有基である。)を示し、pは、YのMへの結合数を表わす0 ~ 2の整数を示す。】で表される蛍光標識用色素。

(2) 上記 (1) の蛍光標識用色素を含有する試薬。

(3) 上記 (1) の蛍光標識用色素で標識された生物由来物質。

(4) 上記 (3) の標識された生物由来物質を含有する試薬。

(5) 生物由来物質が抗原、抗体又はヌクレオチドである上記 (3) 又は (4) の試薬。

(6) 抗原が薬物である上記 (5) の試薬。

(7) 抗体がモノクローナル抗体である上記 (5) の試薬。

(8) ヌクレオチドがオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドである上記 (5) の試薬。

(9) ヌクレオチドがATP、CTP、GTP、TTP、UTP、dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP、ddATP、ddCTP、ddGTP、ddTTTP、ddUTP又はこれらの誘導体である上記(5)の試薬。

【0010】本発明の化2の化合物において、R<sup>1</sup>～R<sup>4</sup>のX中のR<sup>5</sup>及びR<sup>6</sup>のアルキル基の具体例としては、メチル基、エチル基、プロピル基、sec-プロピル基、n-ブチル基、iso-ブチル基、t-ブチル基、ベンチル基、ヘキシル基等があり、アリール基の例としては、フェニル基、チエニル基、フリル基、ビロリル基、トリル基、アニシル基、4-アミノフェニル基等があり、アラルキル基としては、ベンジル基、2-フェニルエチル基、1-フェニルエチル基、3-フェニルプロピル基、2-フェニルプロピル基、1-フェニルプロピル基等がある。また、Y中のR<sup>13</sup>及びR<sup>14</sup>の親水性置換基を有するものであってもよいアルキル基の具体例としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ベンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ドデシル基、テトラデシル基、ヘキサデシル基、オクタデシル基、エイコシル基、ドコシル基等の直鎖、分枝及び脂環状の基があり、親水性置換基を有するものであってもよいアシル基の例としては、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、バレリル基、ビバロイル基、ヘキサノイル基、オクタノイル基、ラウリル基、バルミチル基、ステアリル基等があり、親水性置換基を有するものであってもよいシリル基としては、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、トリプロピルシリル基、トリブチルシリル基、トリアミルシリル基、トリヘキシルシリル基、t-ブチルジメチルシリル基、ジ(t-ブチル)メチルシリル基、ジメチルフェニルシリル基、ジフェニルメチルシリル基、トリフェニルシリル基等がある。

【0011】QはXとWを結合する基で、C<sub>1</sub>～C<sub>8</sub>の飽和又は不飽和の直鎖状、分枝状又は脂環状の結合基、例えば、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基、テトラメチレン基、プロピレン基、ビニレン基、プロペニレン基、シクロプロピレン基、シクロベンチレン基、シクロヘキシレン基等のほか、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアルコール等の基がある。

【0012】W中、R<sup>7</sup>～R<sup>12</sup>のC<sub>1</sub>～C<sub>10</sub>のアルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、アミル基、ヘキシル基、ヘプチル基、ノニル基、デシル基の直鎖状、分枝状及び環状の基があり、C<sub>6</sub>～C<sub>12</sub>のアリール基としては、フェニル基、トリル基、アニシル基、ナフチル基、ビフェニル基等があり、C<sub>6</sub>～C<sub>12</sub>のアラルキル基としては、ベンジル基、2-フェニルエチル基、1-フェニルエチル基、3-フェニルプロピル基、2-フェニルプロピル基、1-フェニルブロピル基等がある。

【0013】また、R<sup>13</sup>及びR<sup>14</sup>で表されるリン原子を含む置換基としては、

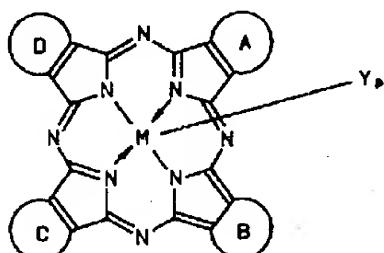
-P(=O)R<sup>15</sup>R<sup>16</sup>、-P(=O)(NR<sup>17</sup>R<sup>18</sup>)<sub>2</sub>、-PR<sup>19</sup>、

(R<sup>15</sup>～R<sup>19</sup>は、それぞれ独立に、アルキル基、アリール基、アシル基、シクロアルキル基、アルコキシル基、アリールオキシル基、ポリエーテル基、ヒドロキシル基又はハロゲン原子を示し、それらは種々の置換基を持つていてよい。)がある。

【0014】化2中、Yが-OR<sup>13</sup>又は-NR<sup>14</sup>、(R<sup>13</sup>及びR<sup>14</sup>は、アルキル基、アシル基及びシリル基を示す)であり、pが1又は2を表わす化合物は、化2中、Yが-OH又は-NH<sub>2</sub>である化合物を、相当するアルコール、アシルクロリド、シラノール、クロロシラン、クロロホスフィン、クロロホスファイト又はホスフォリルクロリドなどと反応させることによって合成できる。化2中、Yが-OH又は-NH<sub>2</sub>であり、pが1又は2である化合物は、化2中、Yがハロゲン原子であり、pが1又は2で表される化合物を加水分解又は加アンモニア分解することによって得ることができる。化2中、Yがハロゲン原子であり、pが1又は2で表される化合物、及びpがゼロでYをもたない化合物は、次の2つの経路により合成することができる。

【0015】第1の経路は文献(J. Chem. Soc. 911頁(1937年))記載の方法を参考にして、化3

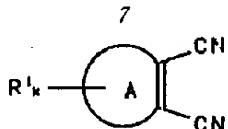
【化3】



(式中、MはH<sub>2</sub>、Al、Si、P、Ga、Ge、Cd、Sc、Mg、Sn又はZnを示し、Yはハロゲン原子を示し、pはYのMへの結合数を表わす0～2の整数を示し、A、B、C、及びDで示される芳香環は、それぞれ独立にチオフェン環、フラン環、ピロール環、イミダゾール環、チアゾール環、オキサゾール環、イソチアゾール環又はピラゾール環を示す。)で表される化合物を得、次にこれに、化2において、置換基R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>又はR<sup>4</sup>を形成しうるR<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>又はR<sup>4</sup>部位を有する化学種を反応させることにより化2で表される化合物を得る方法である。

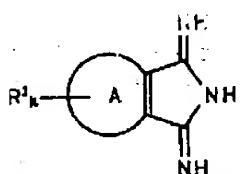
【0016】第2の経路は、化4

【化4】



又は化5

【化5】



(化4及び化5中、Aで示される芳香環は、それぞれ独立にチオフェン環、フラン環、ピロール環、イミダゾール環、チアゾール環、オキサゾール環、イソチアゾール環又はピラゾール環を示し、R¹及びkは、化2中と同じ意味)で表される化合物を、相当する金属又は金属塩と反応させることによって得ることができる。- いっぽう、化2中、MがH₂の場合は、化4及び化5で表される化合物をN a又はL₁アルコキシドと反応させ、次いで加水分解することにより得ることができる。化5で表される化合物は、化4で表される化合物をメタノール中、ナトリウムメトキシド存在下アンモニアと反応させることによって得ることができる。

【0017】本発明において用いられる生物由来物質としては、動物、植物、微生物(ウイルスを含む)等の生物から得られるタンパク質、ペプチド、ヌクレオチド、糖類、脂質、ホルモン、ビタミン、アルカロイド、抗生素質、それらの複合物等があり、これらは、天然から抽出したもの、人工的に完全合成したもの、あるいは人工的に半合成したものいすれであってもよい。タンパク質・ペプチドの具体例としては、血清アルブミン、IgG・IgA・IgM・IgD・IgE等の免疫グロブリン、種々のタンパク質や白血球の膜抗原に対するモノクローナル抗体、バーオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルカリリホスファターゼ等の酵素等が挙げられ、ヌクレオチドの具体例としてはDNA、RNA、合成オリゴヌクレオチド、合成ポリヌクレオチド、ATP、CTP、GTP、TTP、UTP、dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP、ddATP、ddCTP、ddGTP、ddTTP、ddUTP、あるいはそれらの誘導体等が挙げられ、糖類の具体例としては、グリコーゲン、デンプン、マジナン等の多糖類のほかオリゴ糖やグルコース、マンノース等の单糖類が挙げられ、脂質としては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノラミン、脂肪、脂肪酸等が挙げられ、ホルモンとしてはインシュリン、成長ホルモン、オキシトシン、バソプレッシン、セクレチン、上皮細胞成長因子、ガストリン、グルカゴン、カルシトニン等のペプチド性ホルモン、アンドロゲン、エストロゲン、ハイドロコチゾン等のステロイドホルモン、アドレナリン、ノルアドレナリン等のカテコラミン類等が挙げられ、ビタミンとして

はビタミンA、ビタミンB₁、B₂、B₆、B₁₂、ビオチン、葉酸、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE等の各種ビタミンが挙げられ、アルカロイドとしてはモルフィン等のアヘンアルカロイド、アトロビン、スコボラミン等のトロパンアルカロイド、ビンプラスチン、ビンクリスチン等のインドールアルカロイド、オウレン等のイソキノリンアルカロイド等が挙げられ、抗生素質としては、ペニシリン、セファロスポリン、カナマイシン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール等が挙げられる。

【0018】生物由来物質に蛍光標識用色素を結合させた場合には、生物由来物質中のアミノ基、水酸基等の官能基と蛍光標識用色素中のカルボキシル基、スルフォン基等の官能基を利用して直接、イオン結合的又は共有結合的に直接結合させるか、あるいは蛍光標識用色素が反応できるように、生物由来物質の一部に結合基(リンカー)を附加する等の化学修飾を施したのち、反応させればよい。蛍光標識用色素で標識された生物由来物質はクロマトグラフィー、再結晶等の慣用の分離手段により精製することができる。

【0019】化2で表される化合物は、フタロシアニンに比べて短波長域(660nm以下)にQ(0,0)帯に基づく大きな吸収極大を有することから、660nmに発振波長をもつ安価で小型の半導体レーザーを用いて測定するための、種々の抗原、薬物の分析あるいはDNAの塩基配列の分析等に有用な、精度の高い試薬又は臨床検査試薬として利用できる。

【0020】  
【実施例】以下、実施例により更に具体的に本発明を説明する。

## 実施例 1

(1) 化2中、MがZn、R¹～R⁴がいすれもヒドロキシカルボニル基、A、B、C及びDがいすれもチオフェン環、k、l、m及びnがいすれも1、かつpが0でYのない化合物の合成

文献[J. Chem. Soc., 911頁(1937年)]記載の方法を参考にして、化2中、MがZn、R¹～R⁴がいすれもヒドロキシカルボニル基、A、B、C及びDがいすれもチオフェン環、k、l、m及びnがいすれも1、かつpが0でYのない化合物を合成した。

【0021】(2) リンカーが結合したオリゴヌクレオチド・プライマーの合成

固相CED-ウォスフォラミド法を用いた自動DNA合成装置によりプライマー(5'-GTTTCCCCAGTCACGAC-3')を合成した。合成したプライマーのリン酸化は、5.0mMトリス-塩酸(pH 7.6)、1.0mM塩化マグネシウム、1.0mMジチオスレイトール、3mM ATP、T₄-ヌクレオチドカイネースを含む100μlの反応液中で37℃、1時間保温して行った。リン酸化されたプライマーは、ゲル濾過用カラムを

使用して高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離し、リン酸化されたプライマーのピークを集め、凍結乾燥で溶媒を除いた。次に、これを 250 mM の 1, 2-ジアミノエタン (pH 6.0), 200 mM のエナル-3 (3-ジエチルアミノプロピル) カルボジイミド及び 100 mM の N-メチルイミダゾール (pH 6.0) を含む反応液 100 μl 中、25°C で一晩保温して 5' 末端のグアノシンのリン酸部にリンカー [NH<sub>2</sub>-(C<sub>H<sub>2</sub></sub>)<sub>2</sub>-NH-] を結合させた。

【0022】(3) 化2中、MがZn、R<sup>1</sup>～R<sup>4</sup>がいずれもヒドロキシカルボニル基、A、B、C及びDがいずれもチオフェン環、k、l、m及びnがいずれも1、かつpが0でYのない化合物によって標識されたオリゴヌクレオチド・プライマーの合成上記(1)で合成した化合物と上記(2)で合成した5'末端グアノシンのリン酸部にリンカーが結合したオリゴヌクレオチド・プライマーを、0.2 M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.3) 中で混合し、25°C で一晩、暗所に保温したのち、HPLC で精製することにより、リンカーを介して化2中、MがZn、R<sup>1</sup>～R<sup>4</sup>がいずれもヒドロキシカルボニル基、A、B、C及びDがいずれもチオフェン環、k、l、m及びnがいずれも1、かつpが0でYのない化合物の結合したプライマーを得た。

【0023】(4) DNAの塩基配列の分析  
既知の塩基配列のDNAをサンプルとし、リンカーを介して化2中、MがZn、R<sup>1</sup>～R<sup>4</sup>がいずれもヒドロキシカルボニル基、A、B、C及びDがいずれもチオフェン環、k、l、m及びnがいずれも1、更にpが0でYのない化合物の結合したプライマーを用いて、それぞれ4種の塩基でサンガー反応を行ったのち、それぞれ別々のレーンで電気泳動分離し、650 nm の発振波長の半導体レーザーを搭載したDNAシークエンサーで分析した。その結果、DNAの340 塩基までを 99% の精度で決定できた。

【0024】実施例2

文献 [J. Chem. Soc., 911 頁 (1937 年)] 記載の方法を参考にして、化2中、MがH<sub>2</sub>、R<sup>1</sup>～R<sup>4</sup>がいずれもスルフロン酸基、A、B、C及びDがいずれもチオフェン環、k、l、m及びnがいずれも1、更にpが0でYのない化合物を合成した。以下、実施例1と同様に操作して、リンカーを介してこの化合物が結合したプライマーを得、これを用いて、既知の塩基配列のDNAを分析した結果、DNAの380 塩基までを 99% の精度で決定できた。

【0025】実施例3

文献 [J. Chem. Soc., 911 頁 (1937 年)] 記載の方法を参考にして、化2中、MがA1、R<sup>1</sup>～R<sup>4</sup>がいずれも 5-カルボキシプロピオニル基、A、B、C及びDがいずれもチオフェン環、k、l、m及びnがいずれも1、更にpが0でYのない化合物を合成した。以下、実施例1と同様に操作して、リンカーを介してこの化合物が結合したプライマーを得、これを用いて、既知の塩基配列のDNAを分析した結果、DNAの280 塩基までを 99% の精度で決定できた。

【0026】実施例4

文献 [J. Chem. Soc., 911 頁 (1937 年)] 記載の方法を参考にして、化2中、MがZn、R<sup>1</sup>～R<sup>4</sup>がいずれも 5-カルボキシバレリル基、A、B、C及びDがいずれもチオール環、k、l、m及びnがいずれも1、かつpが0でYのない化合物を合成した。以下、実施例1と同様に操作して、リンカーを介してこの化合物が結合したプライマーを得、これを用いて、既知の塩基配列のDNAを分析した結果、DNAの320 塩基までを 99% の精度で決定できた。

【0027】

【発明の効果】本発明により、660 nm 以下の波長域に発振波長をもつ半導体レーザーを用いて測定するための、種々の抗原、薬物あるいはDNAの塩基配列等の分析に有用な試薬又は臨床検査試薬を提供できた。